

铁皮石斛药材HPLC 指纹图谱研究

殷放宙, 陆兔林*, 蔡宝昌*, 郁红礼, 王巧晗, 李 林

(南京中医药大学, 江苏 南京 210046)

摘 要:目的 建立铁皮石斛药材的RP-HPLC 指纹图谱。方法 采用梯度洗脱的方法, 以Kromasil®KR 100-5C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为分析用色谱柱, 以乙腈-0.4% 磷酸溶液为流动相建立了铁皮石斛药材的指纹图谱, 并进行了相似度的计算。结果 该方法可使铁皮石斛中各成分得到较好的分离, 并根据检测结果确定了15个共有指纹峰。结论 该指纹图谱检测方法简便、重现性好, 可作为铁皮石斛药材质量控制的重要方法。

关键词: 铁皮石斛; 指纹图谱; 高效液相; 相似度

中图分类号: R 282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)03-0433-03

Fingerprint of dry stem in *Dendrobium candidum* by HPLC

Y N Fang-zhou, LU Tu-lin, CA I Bao-chang, YU Hong-li, WANG Qiao-han, LI Lin

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

Abstract: **Objective** To establish the fingerprint for the dry stem in *Dendrobium candidum* by RP-HPLC. **Methods** Kromasil®KR 100-5 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with a mixture of acetonitrile-0.4% phosphorus acid as mobile phase in a gradient mode and the data were analyzed with "Computer Aided Similarity Evaluation" software. **Results** The chemical constituents of *D. candidum* were optimally separated, among which 15 fingerprint peaks in common were confirmed. **Conclusion** This method is simple, accurate with good reproducibility, and can be used specifically for the quality control of *D. candidum*.

Key words: *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.; fingerprint; HPLC; similarity

铁皮石斛是兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. 的干燥茎, 为临床常用中药。具有益胃生津、滋阴清热之功效。用于阴伤津亏, 口干烦渴, 食少干呕, 病后虚热, 目暗不明等症。《中国药典》2005年版对铁皮石斛药材的质量控制仍停留在简单的性状鉴别^[1], 这远远不能实现对铁皮石斛药材进行全面的质​​量控制, 鉴于高效液相指纹图谱在药材质量控制上的优势, 本实验参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的相关要求, 利用梯度洗脱法建立了铁皮石斛药材的液相色谱指纹图谱, 为铁皮石斛药材整体质量控制提供了借鉴。

1 仪器、试剂与药材

Agilent 1100 液相色谱仪(美国惠普公司), 电子天平(Mettler Toledo AG285), 乙腈(Tedia 公司, 色谱纯), 甲醇、磷酸(上海化学试剂有限公司, 分析纯)。10批铁皮石斛药材采集于云南思茅石膏井镇, 经南京中医药大学药学院陆兔林教授鉴定为兰科植物铁

皮石斛 *D. candidum* Wall. ex Lindl. 的干燥茎。

2 方法及结果

2.1 指纹图谱色谱条件及药材提取方法的确定

2.1.1 色谱条件^[2]: 色谱柱为 Kromasil®KR 100-5C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.4% 磷酸溶液(B) 进行线性梯度洗脱, 0~5 min 3%A~10%A, 5~12 min 10%A~15%A, 12~25 min 15%A~22%A, 25~40 min 22%A~35%A, 40~50 min 35%A~55%A, 50~60 min 55%A~60%A; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长 270 nm; 柱温 30 °C; 运行时间为 60 min。

2.1.2 供试品溶液的制备: 取铁皮石斛药材, 50 °C 干燥 4 h, 粉碎, 过 60 目筛。取药材粉末 1 g, 精密称定, 置于索氏提取器中, 加甲醇 50 mL 水浴回流 4 h, 提取液挥去部分溶剂, 冷却, 加甲醇定容至 10 mL, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.1.3 测定法: 精密吸取供试品溶液 10 μL, 注入高

* 收稿日期: 2007-05-09

作者简介: 殷放宙(1976—), 女, 江苏南京人, 讲师、博士, 主要从事中药质量标准的研究。

Tel: 13951727393 E-mail: yfz2003@163.com

* 通讯作者 陆兔林 Tel: (025) 85811513 E-mail: lutuling2005@126.com

蔡宝昌 Tel: (025) 85811112 E-mail: bccai@126.com

效液相色谱仪,记录60 min 的色谱图,梯度平衡时

间10 min。铁皮石斛药材的典型指纹图谱见图1。

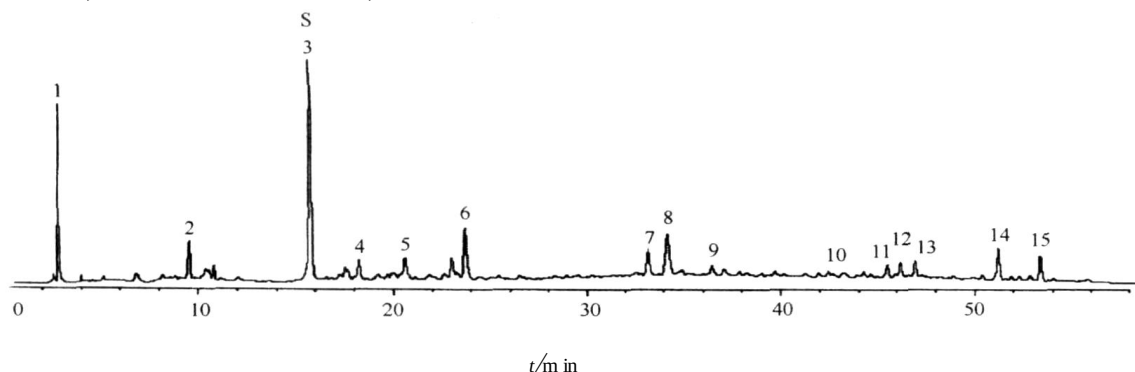


图1 铁皮石斛药材的典型指纹图谱

Fig. 1 Typical fingerprint of *D. candidum*

2.2 方法学考察

2.2.1 空白试验:精密吸取空白溶液(甲醇)10 μ L,注入高效液相色谱仪,按规定的梯度条件进行洗脱。结果表明空白不干扰测定。

2.2.2 分析时间确定试验:取铁皮石斛供试品溶液按要求进样,在洗脱60 min 后,再保持60%乙腈60 min,经分析,铁皮石斛药材2 h 梯度洗脱图谱显示,保留时间60 min 后已无成分残留。确定铁皮石斛指纹图谱的分析时间为60 min。

2.2.3 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别在0、1、4、7、12、16、24、29 h 检测,考察各色谱峰相似度的一致性,利用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年A 版进行相似度评价,相似度平均值为1, RSD 为0.1%。结果表明供试品在29 h 内稳定。

2.2.4 精密度试验:取同一供试品溶液,连续进样5次,考察各色谱峰相似度的一致性,利用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年A 版进行相似度评价,相似度平均值为0.999, RSD 为0.0%。结果表明仪器精密度良好。

2.2.5 重现性试验:取同一批铁皮石斛药材分别提取制备5 份供试品,进行检测,考察各色谱峰相似度的一致性,利用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年A 版进行相似度评价,相似度平均值为0.999, RSD 为0.1%。结果表明实验重现性良好。

2.3 铁皮石斛共有模式的建立

2.3.1 10 批铁皮石斛药材高效液相指纹图谱的建立:本实验以铁皮石斛地道产地云南思茅石膏井镇所产药材为重点研究品种,于此地共收集10 批药材。铁皮石斛的提取方法及色谱条件参照2.1 项下有关内容,具体图谱见图2。

2.3.2 10 批铁皮石斛药材相似度的比较:将10 批药材的色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年A 版相似度软件,考察色谱峰相似度的一致性,进行相似度的评价。具体数据见表1。

表1 10 批铁皮石斛药材的相似度

Table 1 Similarity of ten batches of *D. candidum* samples

批号	相似度	批号	相似度
1	0.981	6	0.976
2	0.987	7	0.971
3	0.983	8	0.967
4	0.980	9	0.958
5	0.970	10	0.968

2.3.3 铁皮石斛共有指纹峰的确立:以保留时间约为15.7 min 的3 号色谱峰作为参照峰,对10 批药材的指纹图谱进行考察,确定了15 个共有峰(见图2)。并对各峰的相对保留时间及相对峰面积进行了计算,统计各批非共有峰与总峰面积的百分比,其结果为非共有峰面积百分比在6.51%~9.12%,符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》中所规定“非共有峰总面积不得大于总峰面积的10%”的检测要求。

3 讨论

3.1 在实验过程,考察了不同提取溶剂,包括石油醚、二氯甲烷、甲醇、乙醇、95%乙醇、70%乙醇、50%乙醇、70%甲醇、50%甲醇等对样品提取效果的影响,色谱图表明甲醇对铁皮石斛药材的提取效率较优。对加热回流、索氏提取、超声提取等提取方法进行了比较,结果表明索氏提取法能较好地将成分富集,因此确定索氏提取为样品的提取方法。并进一步考察了提取时间,分别对药材索氏提取2、3、4、5 h 进行了考察,结果表明对大多数色谱峰而言,以4 h 提取效率最高,4、5 h 提取效率无明显差异,因此确定样品的索氏提取时间为4 h。

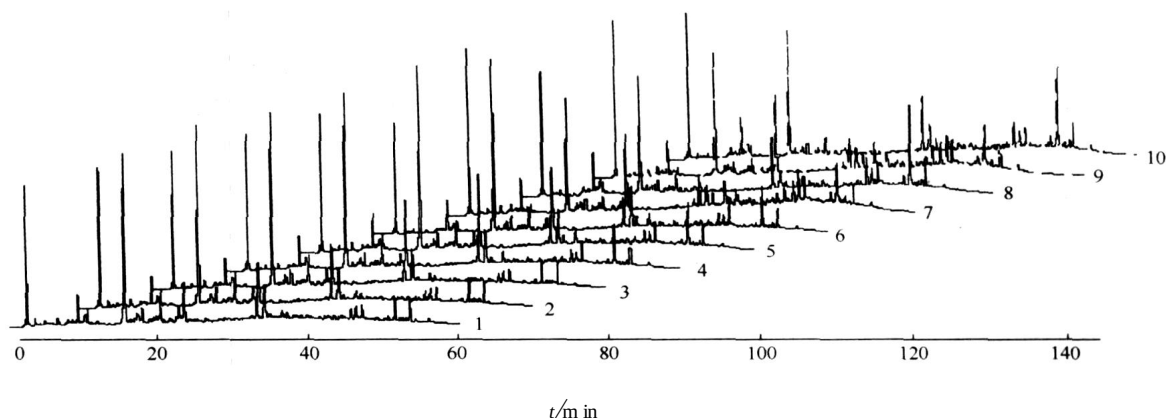


图2 10批铁皮石斛样品指纹图谱叠加图

Fig. 2 Overlaid fingerprint of ten batches of *D. candidum* samples

此外,还考察了药材粉碎的粒度情况,分别进行了20、40、50、60、80目药材的比较实验,结果表明20、40、50目较后两者提取不完全,60、80目提取效率无明显差异,确定药材的粉碎粒度为60目。

3.2 为确定最佳检测波长,首先对铁皮石斛药材的供试品溶液在200~400 nm进行了DAD全波长扫描,发现其在270 nm处能体现较多的吸收峰且强度较大,故选择270 nm作为检测波长。

3.3 为将供试品中的化学成分尽可能洗脱和分离,以最大限度地提供鉴别信息,本研究采用了反相梯度色谱法分离了铁皮石斛药材供试品中性质差异较大的各种组分,考察了甲醇-水、甲醇-0.4%磷酸溶液和乙腈-0.4%磷酸溶液等多种色谱系统,结果表明乙腈-0.4%磷酸溶液系统各色谱峰的分离和峰形

均较好,并对乙腈-0.4%磷酸溶液系统进行了各种梯度的筛选。试验中还将乙腈体积分数上升至100%,观察石斛供试品的色谱行为,图谱显示乙腈上升至60%后均未见有明显的色谱峰出现,因此乙腈相的最终体积分数确定在60%。

同时比较YW G-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Kromasil-5 C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Lichrospher C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)3种色谱柱,相同色谱条件下,以Kromasil-5 C₁₈柱色谱行为较好,因此,选用Kromasil-5 C₁₈柱为指纹图谱分析用色谱柱。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 张尊建,王源园,李茜,等.密花石斛的HPLC/UV/MS指纹图谱研究[J].中草药,2004,35(4):393-395.

欢迎订阅《中国临床药理学杂志》

《中国临床药理学杂志》主要报道我国临床药理学及相关领域的新成果、新技术、新方法,有关临床用药的基础研究,合理用药、药物不良反应、药物相互作用、药物动力学、血药浓度监测以及有关医院药理学学科的研究成果与实践。旨在为我国广大临床药理学工作者提供一个学术交流、信息传递和了解国内外临床药理学及相关学科发展情况的窗口与平台。作为一本专业特色明显的全国性期刊,本刊被收录为国家科技部“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、国家级火炬计划项目“中国科学引文数据库来源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库来源期刊”、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”和“万方数据资源系统(China info)数字化期刊群”,并从1998年起被美国《国际药理学文摘》(IPA)和美国化学文摘(CA)摘录刊载。

本刊的主要读者对象为医院药师、医师和大专院校、科研单位研究人员和临床药理学工作者。

本刊为双月刊,大16开本,64页,逢单月25日出版。每期定价7元,全年42元。邮发代号4-573,欢迎广大读者到本地邮局订阅。

国外代号:4726BM(中国国际图书贸易公司,北京399信箱)。

国内统一刊号:CN 31-1726;国际标准出版物编号:ISSN 1007-4406。

杂志社地址:上海市医学院路138号290信箱 邮编:200032 电话:(021)54237256

传真:(021)64176498 E-mail: cjcjpfdu@citiz.net